

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

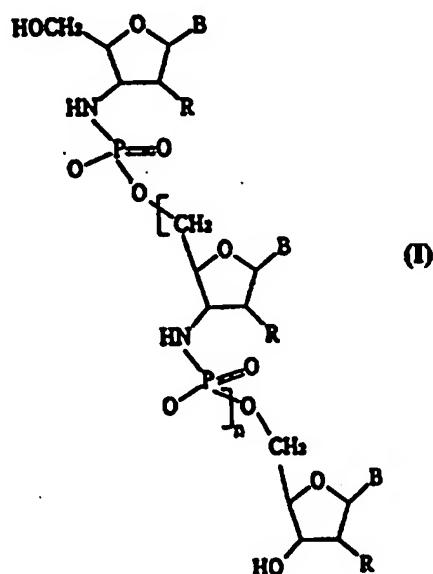
(51) 国際特許分類6 C07H 21/02, 21/04, A61K 31/70		A1	(11) 国際公開番号 WO96/16976
			(43) 国際公開日 1996年6月6日 (06.06.96)
(21) 国際出願番号 (22) 国際出願日 PCT/JP95/02452 1995年12月1日 (01.12.95)			(74) 代理人 弁理士 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.) 〒103 東京都中央区八重洲一丁目8番12号 藤和八重洲一丁目ビル7階 Tokyo, (JP)
(30) 優先権データ 特願平6/324006 1994年12月2日 (02.12.94) JP			(81) 指定国 AT, CA, CN, FI, GE, JP, KR, NO, NZ, RU, UA, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(71) 出願人 ポーラ化成工業株式会社 (POLA CHEMICAL INDUSTRIES INC.)[JP/JP] 〒420-91 静岡県静岡市清水町6番48号 Shizuoka, (JP) ガイサー ティモシー, ジー. (GEISER, Timothy G.) 94402-1201 カリフォルニア州 サンマテオ市 ドーチェス ターロード 525 California, (US)			添付公開書類 国際調査報告書
(72) 発明者 土屋正彦(TSUCHIYA, Masahiko) 〒222 神奈川県横浜市港北区太尾町991番地B-302号室 Kanagawa, (JP)			

(54) Title : ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE AND CARCINOSTATIC AGENT CONTAINING THE SAME

(54) 発明の名称 アンチセンスオリゴヌクレオチド及びそれを用いた制癌剤

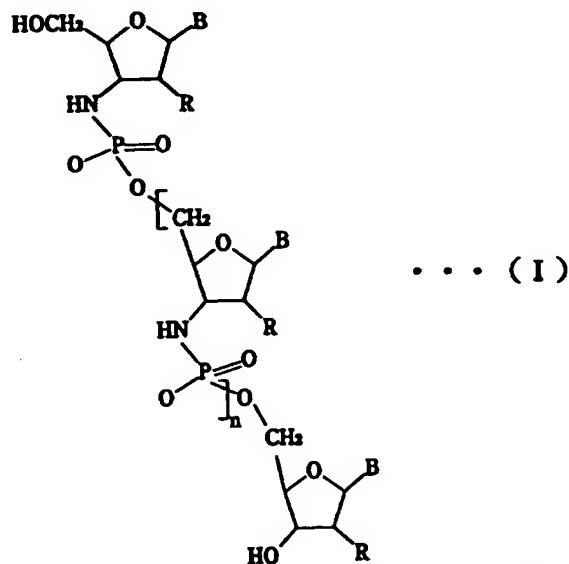
(57) Abstract

An antisense oligonucleotide against protein kinase A-RIC $\alpha$  improved in the carcinostatic effect and containing as the carcinostatic agent an oligonucleotide having the structure represented by general formula (I) and having a base sequence that is substantially complementary to part of the base sequence of the coding strand of the human protein kinase A-RIC $\alpha$  genes represented by SEQ ID No:1 or a base sequence that is substantially complementary to part of the base sequence of the above genes wherein n represents an integer; R represents hydrogen or hydroxy; and B represents a nucleic acid base.



(57) 要約

配列番号1に示すヒトプロテインキナーゼA-R I  $\alpha$ 遺伝子のコード鎖の一部の塩基配列に実質的に相補的な塩基配列、またはこれらの遺伝子の非コード鎖の一部の塩基配列に実質的に相補的な塩基配列を有し、一般式(I)で表される構造を有するオリゴヌクレオチドを制癌剤とし、制癌作用を高めたプロテインキナーゼA-R I  $\alpha$ に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。



(一般式(I)中、nは整数を表し、Rは水素原子又は水酸基を表し、Bは核酸塩基を表す。)

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を固定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DK	デンマーク	LK	スリランカ	PT	ポルトガル
AM	アルメニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RO	ルーマニア
AT	オーストリア	ES	スペイン	LS	レスト	RU	ロシア連邦
AU	オーストラリア	FIR	フィンランド	LT	リトアニア	SDE	スウェーデン
AZ	アゼルバイジャン	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SEE	スウェーデン
BB	バルバドス	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GB	イギリス	MC	モナコ	SI	スロヴェニア
BF	ブルガリア・ファソ	GE	グルジア	MD	モルドバ	SK	スロヴァキア共和国
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SN	セネガル
BI	ベナン	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴ	SZ	スウェーデン
BR	ブラジル	HU	ハンガリー		スラヴェニア共和国	TD	チャード
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	ML	マリ	TG	トーゴ
CA	カナダ	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリー	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴー	JP	日本	MW	マラウイ	TR	トルコ
CH	イス	KE	ケニア	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボアール	KG	キルギスタン	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CN	中国	KR	大韓民国	NO	ノルウェー	US	米国
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	NZ	ニュー・ジーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド	VN	ヴィエトナム

- 1 -

### 明細書

#### アンチセンスオリゴヌクレオチド及びそれを用いた制癌剤

### 技術分野

本発明は、ヒトプロテインキナーゼA、特にヒトプロテインキナーゼA-R1 $\alpha$ に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド及びこのアンチセンスオリゴヌクレオチドからなる制癌剤並びにこの制癌剤を含有する医薬組成物に関する。

### 従来の技術

癌は昔より不治の病として知られているが、それは現在に至っても大きく変化していない。それは癌細胞が生物体自身に由来する、いわば反乱分子であり、基本的な生理機構は正常細胞と大して違いがないため、抗癌剤等で癌細胞を死滅させようすれば、正常細胞をも傷つけてしまい、副作用が発現されるためである。かかる状況を鑑みて、選択的に癌のみを攻撃し治療する方法が検討されてきた。例えば、癌細胞特有の抗原に対するモノクロナール抗体あるいはリポソーム等の担体を利用し、これらに薬剤を担持させる方法が考え出されたが、これらには網内系による捕捉と分解の問題や、モノクローナル抗体あるいは担体と薬剤との結合力の問題や、リリースの問題があり、充分な効果を發揮できなかった。

1980年代前半より各種の遺伝子操作技術が進歩し、癌治療の分野に応用されるようになってきた。これらの内、癌の生理・増殖に特異的に必要な遺伝子に対し、その遺伝子の一部に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチド）を反応させ、いわば癌関連遺伝子に蓋をするアンチセンス技術が考案され、このものについて種々の検討が為されてきた。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは遺伝子発現を、癌細胞に対しても正常細胞に対しても無差別に阻害する為、何の遺伝子発現を抑制するかが重要なポイントになっている。

これらのアンチセンスオリゴヌクレオチドによる制癌作用の中で、ユーン・ス

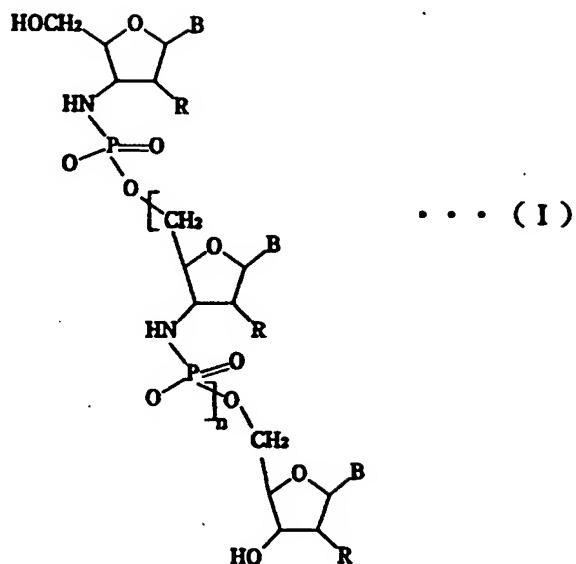
ーン・チョウチュンらがプロテインキナーゼAが増殖期の癌細胞の分裂に必要とされることに注目し、開発したプロテインキナーゼA-R I  $\alpha$ に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの技術は、そのメカニズムの新規性から注目を集めていた（特開平6-211889号）。しかしながら、そのイン・ビボにおける制癌作用は著しく優れているとは言えず、実効性には問題があった。

#### 発明の概要

本発明はかかる状況に鑑みて為されたものであり、制癌作用を高めたプロテインキナーゼA遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供することを課題とする。

本発明者らは上記実状を踏まえ、プロテインキナーゼA遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの制癌作用を実用可能な程度に高めるため、鋭意研究を重ねた結果、ヌクレオチド間の結合をfosphoramideにすることで、制癌作用が著しく高まるを見いだして発明を完成させた。

すなわち本発明は、ヒトプロテインキナーゼA遺伝子の配列の全部又は一部に対して、少なくとも一部が相補的な塩基配列を有し、一般式（I）で表される構造を有するオリゴヌクレオチドである。



(一般式(I)中、nは整数を表し、Rは水素原子又は水酸基を表し、Bは核酸塩基を表す。)

ヒトプロテインキナーゼA遺伝子の一部としては、ヒトプロテインキナーゼAのレギュラトリーパートまたはその一部をコードする配列が挙げられる。さらに、レギュラトリーパートとしては、R I- $\alpha$ が挙げられる。

さらに本発明は、上記オリゴヌクレオチドからなる制癌剤、及びこの制癌剤から選ばれる1種以上を含有する癌治療用の医薬組成物を提供する。

尚、本明細書において、「アンチセンスオリゴヌクレオチド」とは、遺伝子又はmRNAにハイブリダイズすることによってその遺伝子の発現を抑制するオリゴヌクレオチドをいい、遺伝子DNAのコード鎖((+)鎖)あるいはmRNAに相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのみでなく、非コード鎖((-)鎖)に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドも含まれる。

以下、本発明について詳細に説明する。

### (1) 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトプロテインキナーゼA遺伝子の配列の全部又は一部に対して、少なくとも一部が相補的な塩基配列を有する

オリゴヌクレオチドである。ヒトプロテインキナーゼA遺伝子の配列の一部としては、ヒトプロテインキナーゼAのレギュラトリ部分またはその一部をコードする配列が挙げられる。さらに、レギュラトリ部分としては、R I -  $\alpha$ が挙げられる。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、上記のような塩基配列を有し、且つ、オリゴヌクレオチドを構成する各ヌクレオチド間の結合様式が、一般式(I)に示されるような3'アミノ基と5'リン酸基が結合したfosホロアミデート結合(以下、単に「fosホロアミデート結合」という)によるものである。

オリゴヌクレオチドの鎖の長さは、プロテインキナーゼA遺伝子に対する特異性が維持されれば特段の限定は受けない。好ましい鎖長としては塩基数にして9~40である。これは、9未満では遺伝子に対する特異性が少なくなり制癌作用を充分に發揮できない場合があり、40を越えると、塩基配列をコントロールして合成することが著しく困難になるからである。より好ましい鎖長は、効果と経済性のバランスが最も良い、塩基数で15~24のものである。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、プロテインキナーゼA-R I  $\alpha$ の生合成に係わる遺伝子に相補的な配列を有する核酸であれば、その種類は問わない。即ち、ヌクレオチド間の結合がfosホロアミデート結合である限り、DNA型(一般式(I)中、Rが水素原子)のオリゴヌクレオチドであっても、RNA型(一般式(I)中、Rが水酸基)のオリゴヌクレオチドであってもよい。

プロテインキナーゼA-R I  $\alpha$ に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの配列としては、プロテインキナーゼA-R I  $\alpha$ 遺伝子のコード鎖または非コード鎖の塩基配列の一部と実質的に相補的な配列、言い換えれば非コード鎖またはコード鎖の塩基配列の一部と実質的に同一な配列であれば、プロテインキナーゼA-R I  $\alpha$ の生合成を抑制できることが期待される。プロテインキナーゼA-R I  $\alpha$ 遺伝子の塩基配列の一部としては、遺伝子のどの部位であっても上記の効果は期待できるが、より完全にプロテインキナーゼA-R I  $\alpha$ 活性の発現を抑制するという観点からは、該遺伝子のコード鎖の5'末端側、好ましくは開始コドンから100番目のコドンまでの300ヌクレオチドからなる配列の一部であることが好ましい。このプロテインキナーゼA-R I  $\alpha$ 遺伝子のコード領域の300ヌク

レオチドの配列を配列番号1に示す。また、この配列に対するアンチセンス配列（非コード鎖の配列と同じ）を配列番号6に示す。ここで、配列番号1に示す配列と配列番号6に示す配列の関係は相補的関係にあり、遺伝子のどちらの鎖に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドであっても制癌作用は期待できる。

また、配列番号1又は6に示す塩基配列の一部としては、配列番号1においては5'末端側であり、配列番号6については3'末端側であることが好ましい。

ここで、「実質的に相補的」とは、オリゴヌクレオチド中の全てのヌクレオチドがプロテインキナーゼA遺伝子に対して相補的であることを必要とするものではなく、オリゴヌクレオチドが遺伝子DNAまたはmRNAの相当する部位にハイブリダイズし、転写または翻訳を阻害することができる程度に相補的であればよいことを意味する。したがって、生理条件下で特異的なハイブリダイゼーションが阻害されない限り、ヌクレオチド鎖中の一部のヌクレオチドの置換、欠失または挿入があっても良い。

アンチセンスオリゴヌクレオチド中で置き換わってもよいヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さや配列によって異なるが、一般的にオリゴヌクレオチドの両端部近辺は、内部に比べて置換、欠失及び挿入の影響が少なく、A T（又はA U）塩基対の方がG C塩基対に比べて置換の影響が少ない。核酸のハイブリダイゼーション強度の計算方法は公知であり、当業者にとって、配列番号1及び6に示す配列をもとに、生理条件下でのハイブリダイゼーションが損なわれないように一部の配列を改変することは容易である。具体的には、プロテインキナーゼA遺伝子に対して90%以上のホモロジーを有しているものは、多少なりとも所期の効果が期待でき、実質的に相補的であると定義できる。さらに、このようなオリゴヌクレオチドの5'末端又は3'末端に非特異的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付加されていても、実質的に影響を受けない。

又、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するヌクレオチドの種類としては、塩基をチミン、アデニン、シトシン、グアニンとし、糖をデオキシリボースとしたDNA構成ヌクレオチド類縁体でもよく、塩基をウラシル、アデニン、シトシン、グアニンとし、糖をリボースとしたRNA構成ヌクレオチド類縁体でも構わない。さらに、イノシンのように非特異的に他の塩基と水素結合が可

能な塩基を含んでいてもよい。最も好ましいものは、配列番号1の塩基配列に対して相補的な、DNA構成ヌクレオチド類縁体のオリゴヌクレオチドである。

プロテインキナーゼA-R I  $\alpha$ に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの配列としては、配列番号1に示す塩基配列の一部と相補的な配列、すなわち配列番号6に示す配列の一部と同一の配列を有するものとして具体的には、配列番号2、3、4、5に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが挙げられる。また、配列番号6に示す塩基配列の一部と相補的な配列、すなわち配列番号1に示す配列の一部と同一の配列を有するものとして具体的には配列番号7、8、9に示すオリゴヌクレオチドが挙げられる。これらのオリゴヌクレオチドの配列番号1または6に示す配列上の位置を次に示す。

配列番号2：配列番号6の塩基番号280～300

配列番号3：配列番号6の塩基番号46～57

配列番号4：配列番号6の塩基番号148～165

配列番号5：配列番号6の塩基番号250～279

配列番号7：配列番号1の塩基番号1～21

配列番号8：配列番号1の塩基番号244～255

配列番号9：配列番号1の塩基番号136～153

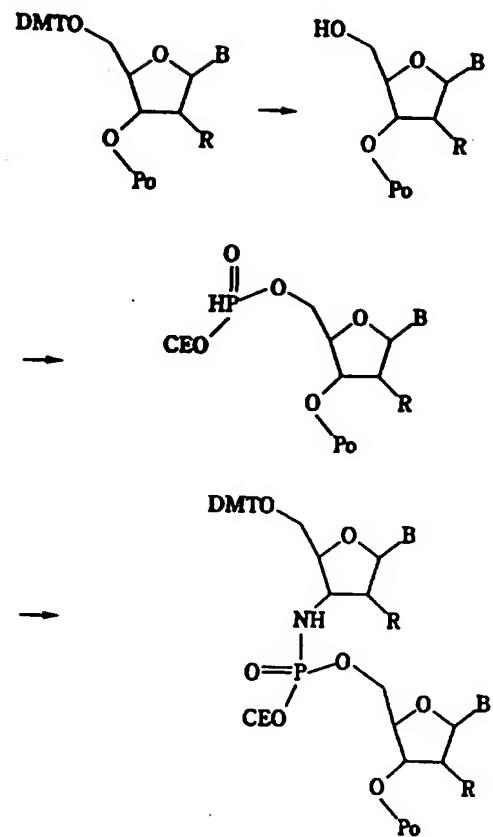
配列番号10：配列番号6の塩基番号280～300

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド同士を一般式(I)に示す様に窒素-塩結合でつなぐことを特徴とする。この様な一般式に表されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、後記実施例に示すように、従来のホスホロチオエート等の結合様式を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドよりも優れた癌抑制効果を有する。

## (2) 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの製造方法

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、下記反応式に従って、順次ヌクレオチドを伸長することにより、塩基配列を制御しながら合成することができる。

- 7 -



(ただし、式中 P o はポリマー残基を表し、R は水素原子又はアシロキシ基を表し、B は核酸塩基を表す。)

即ち、ポリマー等の固相にエステル結合で固定したジメチルトリチル化したヌクレオシドを、ジクロロ酢酸で脱トリチル化し、(2-シアノエトキシ) - (N, N-ジイソプロピルアミノ) クロロホスフィンとN, N-ジイソプロピルエチルアミンを反応させてfosfityl化することにより、シアノエトキシヌクレオチドとし、これにテトラゾールを反応させた後、更にトリエチルアミン存在下、3' -アミノ-5' -ジメチルトリチルデオキシリボヌクレオチドの3' -アミノ基でテトラゾールを置換し、このジメチルトリチル体について同様に3' -アミノ-5' -ジメチルトリチルデオキシリボヌクレオシドを縮合させる操作を繰り返せば、エトキシシアノフォスホロアミデート結合で結合したポリマー上にエステル結合で固定された任意の塩基配列のオリゴヌクレオチドが得られる。これ

をアンモニアを用いて脱ジメチルトリチル化及び脱エステル化すれば一般式（I）で表される構造を有するオリゴヌクレオチドが得られる。

上記一連の反応は、市販されているDNAシンセサイザー、及び上記の反応試薬を用いることにより、自動的に任意の塩基配列のオリゴヌクレオチドを得ることが可能である。上記の反応において、糖鎖部分を2' - アシル - 3' - アミノ - 5' - ジメチルトリチルリボースで置き換えたヌクレオシドを用いれば、RNA類似のアンチセンスオリゴヌクレオチドが得られる。

#### （3）本発明の制癌剤

本発明の制癌剤は、上記記載のオリゴヌクレオチドから選ばれる1種以上からなる。オリゴヌクレオチドは、二種以上の混合物として用いると、より高い制癌作用が得られる場合がある。

本発明の制癌剤は後記実施例に示すように、各種の癌細胞に対して優れた制癌作用を示す。本発明の制癌剤が有効な癌は、ヒトの癌であれば特に限定はない。動物の癌に対しては、本発明の制癌剤であるアンチセンスオリゴヌクレオチドがヒトのプロテインキナーゼA - R I  $\alpha$  遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドであるため、有効でない場合があることも予想される。

本発明の制癌剤が有効な癌としては、具体的に例示すれば、白血病、大腸癌、直腸癌、結腸癌、肺癌、胃癌、肝臓癌、腎臓癌、悪性リンパ腫、舌癌、食道癌、乳癌、咽頭癌、脳腫瘍、悪性筋腫、メラノーマ、子宮頸癌等が挙げられる。本発明の制癌剤の好ましい投与量であるが、病種や病状、年齢、体重、性別、体調などにより異なるが、おおよそ成人一人一日当たり、10 mg ~ 200000 mg を一回ないしは数回に分けて投与するのが適当である。投与経路としては、静脈内、動脈内、門脈内、皮下、皮内、筋肉内、病巣内等へ投与する注射による投与、経口投与等が例示できる。

#### （4）本発明の制癌用の医薬組成物

本発明の医薬組成物は上記制癌剤と剤形上の任意成分とからなる。剤形上の任意成分は通常医薬組成物に用いられているものであれば特に制限無く用いることができる。例えば、経口製剤としては、增量剤、結合剤、嬌味嬌臭剤、崩壊剤、滑沢剤、被覆剤、糖衣剤等が例示でき、注射剤としては、pH調節剤、等張剤、

安定剤等が例示できる。また、他の制癌作用が知られている薬剤とともに製剤化してもよい。これらの制癌剤と任意成分を剤形化する方法は、通常の方法によれば良い。

#### 好適な実施例の詳細な説明

以下に実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明がこれら実施例に何等限定を受けないことは言うまでもない。

#### 実施例1 アンチセンスオリゴヌクレオチドの製造例（1）

上記に述べた方法により、核酸合成機 A B I 3 8 4 シンセサイザー（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、配列番号 2、3、4、5、7、8、9 に示す塩基配列を有する DNA 型のオリゴヌクレオチドを合成した。即ち、ポリマーにエステル結合で固定した各配列の 3' 末端塩基を有するジメチルトリチル化したヌクレオシドを、ジクロロ酢酸の 3 % 塩化メチレン溶液を用い 1.5 分間処理して脱ジメチルトリチル化反応を行った。さらに 0.2 モルの (2-シアノエトキシ) - (N, N-ジイソプロピルアミノ) クロロホスフィンと 0.2 モルの N, N-ジイソプロピルエチルアミンの塩化メチレン溶液を用いてフォスフィチル化反応を 10 分間行い、シアノエトキシヌクレオチドとした。これに 0.4 モルのテトラゾールの 90 % アセトニトリル水溶液に溶解した溶液を用いて 5 分間反応させたてテトラゾリル化した後、3' 末端から 2 番目の塩基を有する 0.2 モルの 3' - アミノ - 5' - ジメチルトリチルデオキシリボヌクレオシドと 0.2 モルのトリエチルアミンの 50 % 四塩炭アセトニトリル溶液を用いてこれらのヌクレオシドのカップリングを 20 分間行った。

上記と同様にして、各塩基配列に従って順次ヌクレオシドを結合させ、最後にアンモニアのメタノール飽和溶液を用いて 5' 末端のヌクレオチドの脱ジメチルトリチル化、脱シアノエトキシ化及びエステルの加水分解によるポリマーからのオリゴヌクレオチドの離脱を行った。塩基配列は予め自動合成機にインプットしておいた。

- 10 -

### 実施例2 アンチセンスオリゴヌクレオチドの製造例(2)

モノマーヌクレオシドを、2' -アセチル-3' -アミノ-5' -ジメチルトリチルリボヌクレオシドに変えた以外は実施例1と同様にして反応を行い、配列番号10に示す配列を有するRNA型のオリゴヌクレオチドを作製した。

### 実施例3 アンチセンスオリゴヌクレオチドの製造例(3)

実施例1と同様にして、配列番号2に示す塩基配列の5'末端の2塩基GGをTTに置き換えた配列のDNA型オリゴヌクレオチドを合成した。

### 実施例4 白血病細胞に対する制癌作用(イン・ビトロ)

実施例1～3で作製したオリゴヌクレオチドについて、HL-60白血病細胞を用いて増殖抑制作用を調べた。即ち、10%FBS(牛胎仔血清)を添加したRPMI1640培地で培養した後、PBS(磷酸緩衝生理食塩水)で2回洗浄した細胞を、10%FBS添加RPMI1640培地で希釈し $2 \times 10^6$ 個/mLの濃度に調整した。これに最終濃度が所定の濃度になるように調整した、各種濃度の実施例1～3で製造したオリゴヌクレオチドの生理食塩水溶液を加えた。その後1週間5%炭酸ガス混合ガス雰囲気で37℃の温度で培養し、毎日細胞数をカウントした。培養開始7日後の細胞数より、細胞増殖を100%抑制する最小濃度を決定した。尚、ポジティブコントロールとしては、特開平6-211889号記載の配列番号1のチオオリゴヌクレオチド(21マー)、即ち、本発明の実施例1の配列番号2のオリゴヌクレオチドの結合様式をfosホロアミデートからfosホロチオエーテルに変えたものを用いた。結果を表1に示す。

この結果より、本発明のオリゴヌクレオチドが制癌作用を有していること及び本発明のオリゴヌクレオチドが従来のオリゴヌクレオチドよりすぐれた制癌作用を有することが判る。

表1

オリゴヌクレオチド	増殖抑制濃度 ( $\mu M$ )
実施例 1 配列番号 2	0. 2
実施例 1 配列番号 3	2
実施例 1 配列番号 4	0. 8
実施例 1 配列番号 5	0. 8
実施例 1 配列番号 7	4
実施例 1 配列番号 8	2
実施例 1 配列番号 9	4
実施例 2 配列番号 10	8
実施例 3	16
ホスホロチオエート配列番号 2	32

実施例 5 結腸癌細胞に対する制癌作用（イン・ビトロ）

実施例 4 と同様に、結腸癌由来細胞 L S 1 7 4 T を用いて増殖抑制作用を見た。完全増殖抑制最小濃度を表 2 に示す。これより、本発明のオリゴヌクレオチドは結腸癌に対しても白血病と同様の作用を示すことがわかる。

表2

オリゴヌクレオチド	増殖抑制濃度 ( $\mu M$ )
実施例 1 配列番号 2	0. 1
実施例 1 配列番号 3	4
実施例 1 配列番号 4	0. 8
実施例 1 配列番号 5	0. 4
実施例 1 配列番号 7	2
実施例 1 配列番号 8	4
実施例 1 配列番号 9	4
実施例 2 配列番号 10	16
実施例 3	32
ホスホロチオエート配列番号 2	32

### 実施例 6 結腸癌細胞に対する制癌作用（イン・ビボ）

結腸癌由来細胞 L S 1 7 4 T を用いて、これをヌードマウス（雄性、1群5匹）に移植し、その増殖に対する本発明の抑制作用を調べた。即ち、前培養し濃度を  $2 \times 10^7$  個/m l に調整した癌の分散液を 0. 1 m l 右側背部皮膚に注射して癌細胞を移植し、7日飼育した後、実験に使用した。即ち、オリゴヌクレオチドを最終濃度で 10 mg/m l になるように、49. 5% のピーナッツオイルと 49. 5% の生理食塩水と 1% のツイーン 80 を混合、乳化したベヒクルに混ぜ込んだ検体を 0. 01 m l 腫瘍と左側背部皮膚に皮下投与し、投与後腫瘍の大きさを測定した。オリゴヌクレオチド投与群の腫瘍の平均体積を無投与群の腫瘍の平均体積から減じ、この値を無投与群の腫瘍の平均体積で除したものに 100 を乗じた数値を増殖抑制率とした。

本発明のオリゴヌクレオチドとしては、配列番号 2 に示す配列を有するオリゴヌクレオチドを、対照品としては実施例 1 に示したホスホロチオエートタイプのオリゴヌクレオチドを用いた。本発明のオリゴヌクレオチドの増殖抑制率が 71 % であったのに対し、対照品のオリゴヌクレオチドは 35 % であった。これより、本発明のオリゴヌクレオチドがイン・ビボに於いても優れた制癌作用を有することが判る。又、オリゴヌクレオチドを投与した後も好ましくない毒性は観察されておらず、安全性並びに毒性に対する効果濃度で示される治療係数も高いものであることがわかる。

### 実施例 7 複数のアンチセンスオリゴヌクレオチドの併用効果

実施例 4 と同様に配列番号 2 に示す配列を有する本発明のオリゴヌクレオチドと配列番号 3 に示す配列を有する本発明のオリゴヌクレオチドの等モル混合物について、HL-60 に対する制癌作用を調べた。細胞増殖抑制最小濃度は 0. 4  $\mu$ M (0. 2  $\mu$ M の配列番号 2 の本発明のオリゴヌクレオチドと 0. 2  $\mu$ M の配列番号 3 の本発明のオリゴヌクレオチドの混合物) で、相加効果以上の効果があることがわかる。

産業上の利用可能性

本発明のプロテインキナーゼA遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは制癌作用が高いので、制癌剤、癌治療用の医療用組成物としてたいへん有用である。

**配列表****(1)一般情報**

- (i) 出願人： ポーラ化成工業株式会社
- (ii) 発明の名称： アンチセンスオリゴヌクレオチド及びそれを用いた制癌剤
- (iii) 配列数： 10
- (iv) 連絡先：
  - (A)宛名：
  - (B)番地：
  - (C)市：
  - (D)州：
  - (E)国：
  - (F)ZIP：
- (v) コンピュータ読み取り可能形式
  - (A)媒体：フロッピーディスク
  - (B)コンピュータ：IBM PC 互換
  - (C)操作システム：PC-DOS/MS-DOS
  - (D)ソフトウェア：FastSEQ Version 1.5
- (vi) 現行出願データ
  - (A)出願番号
  - (B)出願日
  - (C)分類
- (viii)代理人／事務所情報
  - (A)名前：
  - (B)登録番号：
  - (C)整理番号：
- (ix)通信情報
  - (A)電話番号：
  - (B)ファクシミリ番号：

**(2) 配列番号 1 の配列の情報：**

- (i) 配列の性質：
  - (A) 配列の長さ： 300 bases
  - (B) 配列の型：核酸
  - (C) 鎮の数：一本鎮

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Genomic DNA

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列: SEQ ID NO:1:

ATGGAGTCTG GCAGTACCGC CGCCAGTGAG GAGGCACCGA GCCTTCGAGA ATGTGAGCTC	60
TACGTCCAGA AGCATAACAT TCAAGCACTG CTCAAAGATT CTATTGTGCA GTTGTGCACT	120
GCTCGACCTG AGAGACCCAT GGCATTCCCTC AGGGAATACT TTGAGAGGTT GGAGAAGGAG	180
GAGGCAAAAC AGATTCAAGAA TCTGCAGAAA GCAGGCACTC GTACAGACTC AAGGGAGGAT	240
GAGATTTCTC CTCTCCACC CAACCCAGTG GTTAAAGGTA GGAGGGGACG AGGTGCTATC	300

(2) 配列番号 2 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 21 bases

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎮の数: 一本鎮

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

(iv) アンチセンス: YES

(xi) 配列: SEQ ID NO:2:

GGCGGTACTG CCAGACTCCA T 21

(2) 配列番号 3 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 12 bases

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎮の数: 一本鎮

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

(iv) アンチセンス: YES

- 16 -

(xi) 配列: SEQ ID NO:3:

AGGAGGGAGAA AT 12

(2) 配列番号 4 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 18 bases
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎮の数: 一本鎮
- (D) トポロジー: 直鎮状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

(iv) アンチセンス: YES

(xi) 配列: SEQ ID NO:4:

CCTGAGGAAT GCCATGGG 18

(2) 配列番号 5 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 30 bases
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎮の数: 一本鎮
- (D) トポロジー: 直鎮状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

(iv) アンチセンス: YES

(xi) 配列: SEQ ID NO:5:

TTCTCGAAGG CTGCGTGCC TCCTCACTGGC 30

(2) 配列番号 6 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 300 bases
- (B) 配列の型: 核酸

(C) 鎮の数: 一本鎮

(D) トポロジー: 直鎮状

(ii) 配列の種類: Genomic DNA

(iv) アンチセンス: YES

(xi) 配列: SEQ ID NO:6:

GATAGCACCT CGTCGCCTCC TACCTTTAAC CACTGGGTTG GGTGGAGGAG GAGAAATCTC	60
ATCCTCCCTT GAGTCTGTAC GAGTGCCTGC TTTCTGCAGA TTCTGAATCT GTTTTGCCCTC	120
CTCCTTCTCC AACCTCTCAA AGTATTCCCT GAGGAATGCC ATGGGTCTCT CAGGTCCAGC	180
AGTGCACAAC TGCACAATAG AATCTTTGAG CAGTGCTTGA ATGTTATGCT TCTGGACGTA	240
GAGCTCACAT TCTCGAAGGC TGCGTGCCCTC CTCACTGGCG GCGGTACTGC CAGACTCCAT	300

(2) 配列番号 7 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 21 bases

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎮の数: 一本鎮

(D) トポロジー: 直鎮状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列: SEQ ID NO:7:

ATGGAGTCTG GCAGTACCGC C 21

(2) 配列番号 8 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 12 bases

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎮の数: 一本鎮

(D) トポロジー: 直鎮状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列: SEQ ID NO:8:

ATTTCTCCTC CT 12

(2) 配列番号 9 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 18 bases

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎮の数: 一本鎮

(D) トポロジー: 直鎮状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列: SEQ ID NO:9:

CCCATGGCAT TCCTCAGG 18

(2) 配列番号 10 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 21 bases

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎮の数: 一本鎮

(D) トポロジー: 直鎮状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

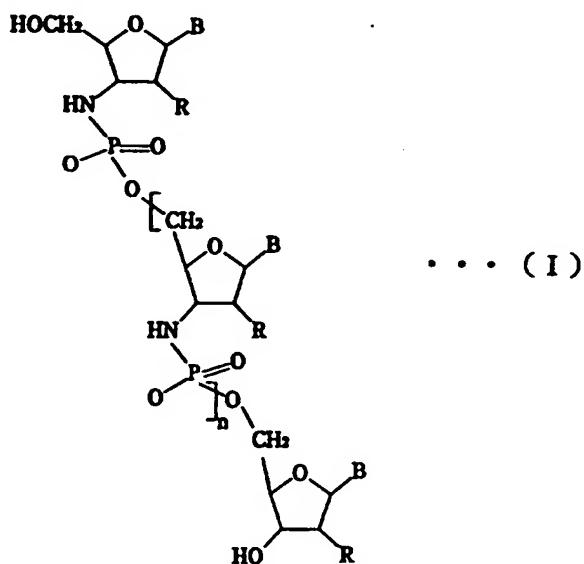
(iv) アンチセンス: YES

(xi) 配列: SEQ ID NO:10:

GGCGGUACUG CCAGACUCCA U 21

## 請求の範囲

1. ヒトプロテインキナーゼA遺伝子の配列の全部又は一部に対して、少なくとも一部が相補的な塩基配列を有し、一般式（I）で表される構造を有するオリゴヌクレオチド。



(一般式（I）中、nは整数を表し、Rは水素原子又は水酸基を表し、Bは核酸塩基を表す。)

2. ヒトプロテインキナーゼA遺伝子の一部がヒトプロテインキナーゼAのレギュラトリーパートまたはその一部をコードする配列である請求項1記載のオリゴヌクレオチド。

3. レギュラトリーパートがR I -  $\alpha$ である請求項1又は2記載のオリゴヌクレオチド。

4. 配列番号1に示すヒトプロテインキナーゼA-R I  $\alpha$ 遺伝子のコード鎖の塩基配列に、少なくとも一部が相補的な塩基配列を有する請求項3記載のオリゴヌクレオチド。

5. 配列番号6に示すヒトプロテインキナーゼA-R I  $\alpha$ 遺伝子の非コード鎖の塩基配列に、少なくとも一部が相補的な塩基配列を有する、請求項3記載のオ

リゴヌクレオチド。

6. 大きさが 9 マー以上 40 マー以下であることを特徴とする請求項 1 ~ 5 の何れか一項に記載のオリゴヌクレオチド。
7. 配列番号 2 ~ 5 又は 10 に示す塩基配列と実質的に同一の塩基配列を有する請求項 4 記載のオリゴヌクレオチド。
8. 塩基配列が配列番号 2 ~ 5 又は 10 に示す塩基配列の何れかである請求項 7 記載のオリゴヌクレオチド。
9. 配列番号 7 ~ 9 に示す塩基配列と実質的に同一の塩基配列を有する請求項 5 記載のオリゴヌクレオチド。
10. 塩基配列が配列番号 7 ~ 9 に示す塩基配列の何れかである請求項 9 記載のオリゴヌクレオチド。
11. 請求項 1 ~ 10 の何れか一項に記載のオリゴヌクレオチドからなる制癌剤。
12. 請求項 11 記載の制癌剤から選ばれる 1 種以上を含有する癌治療用の医薬組成物。

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP95/02452

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int. Cl<sup>6</sup> C07H21/02, C07H21/04, A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C07H21/02, C07H21/04, A61K31/70

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 9313740, A (Worcester foundation for Experimental Biology), July 22, 1993 (22. 07. 93), Claim & JP, 7-506340, A	1 - 12

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  January 31, 1996 (31. 01. 96)	Date of mailing of the international search report  February 20, 1996 (20. 02. 96)
--	--

Name and mailing address of the ISA/  Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer  Telephone No.
---	---

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP 95/02452

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. CL<sup>c</sup> C07H21/02, C07H21/04, A61K31/70

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. CL<sup>c</sup> C07H21/02, C07H21/04, A61K31/70

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ON LINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 9313740, A (Worcester foundation for Experimental Biology), 22. 7月. 1993 (22. 07. 93), CLAIMの項 & JP, 7-506340, A	1-12

 C欄の後きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日  
 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献  
 (理由を付す)  
 「O」図面による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日  
 の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「Z」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  31. 01. 96	国際調査報告の発送日  20.02.96
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(指揮のある職員) 内藤伸一 ④ 4 C 8 6 1 5 電話番号 03-3581-1101 内線 3452